

复方甘草酸苷片在家兔体内的药动学研究

田莉¹,高晓黎^{2,3,*},云奇³,孔金金²,麦合苏木·艾克木²

(1. 新疆医科大学中医学院,新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学药学院,新疆 乌鲁木齐 830011;

3. 新疆特丰药业股份有限公司,新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 建立测定家兔体内甘草酸和甘草次酸血药浓度的 HPLC 法,进行家兔体内复方甘草酸苷片的药动学研究和生物等效性评价。方法 采用双周期自身交叉给药方案,12 只新西兰家兔按 300 mg/kg 剂量 ig 给药,采用 HPLC 法测定不同时间的血-药浓度,经 3p97 药动学软件计算药动学参数。结果 单剂量 ig 复方甘草酸苷片受试制剂和参比制剂后,受试制剂和参比制剂的药动学参数分别为:(1)甘草酸的 MRT 为(44.29 ± 22.89)、(50.31 ± 35.09) h, $t_{1/2}$ 为(28.34 ± 17.89)、(33.22 ± 25.96) h, t_{max} 为(10.9 ± 5.8)、(7.3 ± 3.9) h, C_{max} 分别为(1.81 ± 0.69)、(1.84 ± 0.54) mg/L, $AUC_{0-\infty}$ 为(37.37 ± 9.76)、(39.11 ± 9.88) mg·h/L,相对生物利用度为(99.5 ± 29.0)%;(2)甘草次酸的 MRT 为(37.93 ± 32.97)、(31.42 ± 21.81) h, $t_{1/2}$ 为(18.22 ± 23.67)、(16.50 ± 16.60) h, t_{max} 为(18.10 ± 6.20)、(12.20 ± 5.00) h, C_{max} 分别为(0.54 ± 0.25)、(0.50 ± 0.16) mg/L, $AUC_{0-\infty}$ 为(9.15 ± 3.88)、(8.69 ± 2.30) mg·h/L,相对生物利用度为(110.4 ± 46.3)%。结论 建立的 HPLC 法简便、准确,重现性好,复方甘草酸苷片受试制剂和参比制剂在家兔体内生物等效。

关键词:复方甘草酸苷片;甘草酸;甘草次酸;高效液相色谱;生物等效性

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2009)09-1399-04

复方甘草酸苷片由甘草酸单铵盐、甘氨酸、DL-蛋氨酸组方,在肝病领域主要用于治疗慢性肝病,改善肝功能^[1],在非肝病领域用于过敏性反应(如皮疹、荨麻疹、药物疹)、小儿异位性皮炎、斑秃、系统性红斑狼疮等,临床应用广泛^[2]。甘草酸口服后,大部分被胃肠道菌群代谢为甘草次酸吸收,少量原形药物以主动转运方式进入血液^[3]。鉴于甘草酸的吸收特性,体内需要检测甘草酸及其代谢产物甘草次酸才能全面评价其体内过程。因此本实验建立了可同时测定血浆中甘草酸和甘草次酸的 HPLC 法,进行家兔体内复方甘草酸苷片的药动学研究和生物等效性评价。

1 材料与仪器

新西兰家兔,体质量(2 ± 0.2) kg,由新疆医科大学实验动物中心提供。甘草酸单铵对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0731-200205,质量分数为 90.8%),甘草次酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110723-200411)。参比制剂复方甘草酸苷片(商品名:美能,日本米诺发源制药株式会社生产,每片含甘草酸苷 25 mg、甘氨酸 25 mg、DL-蛋氨酸 25 mg,批号 06105);受试制剂复方甘草酸苷片(新疆特丰药业股份有限公司生产,每片含甘草酸苷

25 mg、甘氨酸 25 mg、DL-蛋氨酸 25 mg,批号 20060514)。甲醇、冰醋酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),BP211D 精密天平(德国 Sartorius);SK-1 型快速漩涡混合器(江苏金坛医疗仪器厂);TGL-16C 高速离心机(上海弗鲁克机电设备有限公司)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件:Zorbax C₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-冰醋酸(78:21:1);体积流量:0.8 mL/min;柱温:35℃;检测波长:250 nm。

2.2 血浆样品的处理:精密吸取 200 μL 血浆至 1 mL 离心管,加入内标溶液 40 μL,加入甲醇 600 μL,漩涡振荡 1 min,在高速离心机上以 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液 50 μL 进样,进行 HPLC 分析。

2.3 给药方案与血样采集:采用双周期自身交叉设计,美能片为参比制剂。12 只健康新西兰家兔,雄性,随机分为两组,禁食不禁水 12 h 后,分别单剂量 ig 给予相同受试制剂和参比制剂(按 300 mg/kg 甘草酸单铵盐计),服药后 0、1、2、4、6、8、10、12、14、16、21、24、30、36 h 从耳缘静脉采血 2 mL 置肝素化离心试管中,4 000 r/min 离心 15 min,分离血浆后

* 收稿日期:2009-03-23

基金项目:新疆维吾尔自治区科技攻关(含重大专项)和重点项目计划(200733146)

作者简介:田莉(1974—),女,四川人,博士研究生,主要从事新药、民族药的研究与开发。

E-mail: tianli109@126.com

* 通讯作者 高晓黎 Tel: (0991) 4312411 E-mail: gxli@tefeng.com

保存于 - 20 °C 冰箱保存。

2.4 方法学评价

2.4.1 专属性试验:在该色谱条件下,按血浆样品的处理方法处理空白血浆、空白血浆加对照品与内

标联苯、家兔给药后的含药血浆,结果甘草酸、甘草次酸与内标完全分离,保留时间分别约为 3.8、14.7、6.7 min,峰形对称性好,且不受内源性杂质的干扰。色谱图见图 1。

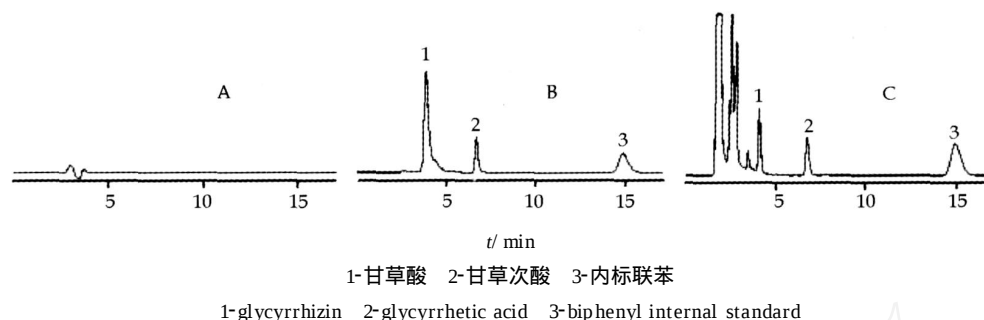


图 1 空白血浆 (A)、加对照品空白血浆 (B) 和给药后血浆样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of blank plasma (A), reference substances in blank plasma (B), and plasma sample (C)

2.4.2 线性与灵敏度:分别精密吸取空白血浆 200 μ L 至 1 mL 离心管,加入内标联苯溶液 40 μ L,加入甘草酸、甘草次酸对照品溶液,使甘草酸质量浓度分别为 0.42、0.85、1.27、4.24、10.6、21.2、38.16、50.88 mg/L,甘草次酸质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、1.01、1.52、2.01、3.03、5.05 mg/L,按血浆样品的处理方法进行,记录甘草酸、甘草次酸和内标峰面积,并以信噪比的 3 倍为最低检出限。以样品与内标峰面积比 (Y) 对质量浓度 (X) 回归,得回归方程。甘草酸: $X = 12.382 Y + 0.5104$, $r = 0.996$,线性范围 0.85 ~ 50.88 mg/L,最低检测质量浓度为 0.85 mg/L;甘草次酸: $X = 5.9489 Y +$

0.0184, $r = 0.998$,线性范围 0.10 ~ 5.05 mg/L,最低检测质量浓度为 0.10 mg/L。

2.4.3 精密度和回收率试验:配制含甘草酸 1.27、21.2、50.88 mg/L,甘草次酸 0.10、1.01、5.05 mg/L 对照品的低、中、高质量浓度空白血浆样品,按“血浆样品的处理方法”处理后进样分析,日内连续测定 5 次,日间连续测定 5 d。以所测质量浓度与加入质量浓度相比,计算空白血浆中甘草酸、甘草次酸的相对回收率和日内、日间精密度。另配制相应质量浓度的标准溶液,不经处理直接以等量进样,计算血浆中甘草酸、甘草次酸的绝对回收率。结果见表 1。

2.5 家兔给药后的药动学试验:新西兰家兔单剂量

表 1 家兔血浆中甘草酸、甘草次酸的日内、日间精密度和回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
Table 1 Precision of intra-day and inter-day determination and recovery rate of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in plasma of rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

样 品	质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	日内精密度		日间精密度		相对回收率/ %	绝对回收率/ %
		测得量/(mg · L ⁻¹)	RSD/ %	测得量/(mg · L ⁻¹)	RSD/ %		
甘草酸	1.27	1.22 $\pm$ 0.05	4.22	1.24 $\pm$ 0.16	12.78	93.27 $\pm$ 2.66	97.37 $\pm$ 3.73
	21.20	21.09 $\pm$ 0.29	1.42	21.01 $\pm$ 0.96	4.56	102.03 $\pm$ 1.25	100.90 $\pm$ 0.21
	50.88	50.57 $\pm$ 0.95	1.87	50.61 $\pm$ 4.33	8.57	99.70 $\pm$ 2.28	99.33 $\pm$ 0.18
甘草次酸	0.10	0.11 $\pm$ 0.02	2.17	0.10 $\pm$ 0.00	0.86	99.03 $\pm$ 2.57	108.66 $\pm$ 6.77
	1.01	1.01 $\pm$ 0.02	1.55	1.01 $\pm$ 0.05	4.85	102.45 $\pm$ 1.23	100.01 $\pm$ 0.34
	4.04	4.01 $\pm$ 0.01	0.28	4.02 $\pm$ 0.34	8.48	100.28 $\pm$ 0.30	99.34 $\pm$ 0.86

ig 受试和参比制剂(按 300 mg/kg 甘草酸单铵盐剂量给药)后的平均药-时曲线见图 2。 C_{max} 、 t_{max} 用实测值表示,AUC 用梯形法计算。采用 3p97 程序计算主要药动学参数,见表 2。 $AUC_{0-36 h}$ 及 C_{max} 进行对数转换后进行方差分析和双单侧 t 检验和 90% 置信区间,对 t_{max} 进行非参数检验法,评价制剂生物等效性。

受试制剂甘草酸相对生物利用度为 (99.5 $\pm$ 29.0) %,甘草次酸为 (110.4 $\pm$ 46.3) %。两制剂主

要药动学参数在制剂间、个体间均无显著性差异 ($P > 0.05$),而周期间甘草酸有差异 ($P < 0.05$),甘草次酸无差异。受试制剂甘草酸和甘草次酸的 $AUC_{0-36 h}$ 90% 可信限分别为 83.05% ~ 109.42%, 85.97% ~ 118.15%,均落在参比制剂的 80% ~ 125%;受试制剂甘草酸和甘草次酸的 C_{max} 90% 可信限分别为 77.03% ~ 119.38%, 90.40% ~ 121.88%,均落在参比制剂的 70% ~ 143%。采用非参数检验法的秩和检验对 t_{max} 进行统计分析可

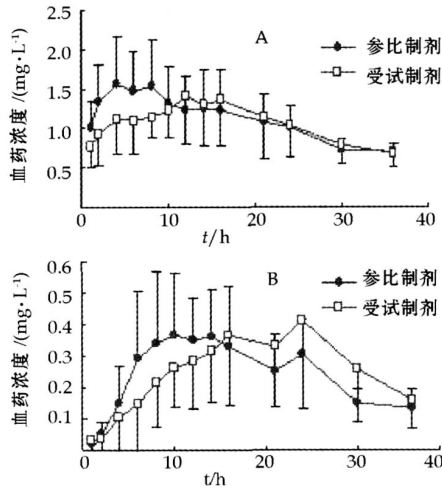


图 2 家兔单剂量 ig 复方甘草酸苷片后甘草酸(A)、甘草次酸(B)的平均药-时曲线($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of glycyrrhizin (A) and glycyrrhetic acid (B) after single ig dose of Compound Glycyrrhizin Tablets in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

表 2 家兔 ig 复方甘草酸苷片的受试制剂和参比制剂后的药动学参数($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of tested tablet and reference tablet of Compound Glycyrrhizin Tablets by ig administration to rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

参 数	单 位	甘草酸		甘草次酸	
		受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂
C_{max}	mg · L ⁻¹	1.81 ± 0.69	1.84 ± 0.54	0.54 ± 0.25	0.50 ± 0.16
t_{max}	h	10.90 ± 5.80	7.30 ± 3.90	18.10 ± 6.20	12.20 ± 5.00
$AUC_{0-\infty}$	mg · L ⁻¹ · h	63.35 ± 12.16	73.21 ± 26.54	14.50 ± 8.25	12.09 ± 3.98
AUC_{0-36h}	mg · L ⁻¹ · h	37.37 ± 9.76	39.11 ± 9.88	9.15 ± 3.88	8.69 ± 2.30
$t_{1/2(\beta)}$	h	28.34 ± 17.89	33.22 ± 25.96	18.22 ± 23.67	16.50 ± 16.60
MRT	h	44.29 ± 22.89	50.31 ± 35.09	37.93 ± 32.97	31.42 ± 21.81

国外有文献采用高效液相色谱法测定新西兰家兔血清中的甘草酸及代谢产物甘草次酸^[4],由于甘草酸和甘草次酸极性差别大,分别采用不同的流动相比例进行测定。本实验依据文献方法^[5-7]进行改进,在同一色谱条件下可同时测定家兔血浆中甘草酸和甘草次酸,方法简便、准确、专属性强,该检测方法可为复方甘草酸苷片的临床研究提供初步依据。

目前,检测在生物样品中的甘草酸及其代谢产物仍以色谱技术为主。如液质联用技术灵敏(可达纳克级)、快速、准确、简便,在定量分析的同时还可进行结构解析,有与无与伦比的优越性,但昂贵的费用制约了其广泛使用。气相色谱法专属性强,检测限低但样品前处理复杂。因此,尽管 HPLC 法灵敏度低于液质联用技术,但由于其高效、快速、简便、经济等特性,仍是国内外检测生物样品中甘草酸及其代谢产物使用最广泛的方法,只是给药剂量均较大,多在 100~500 mg/kg^[5-9]。本实验对甘草酸及其代

知,受试制剂与参比制剂间 t_{max} 无差异。根据生物等效性判断标准,可以认为两种制剂生物等效。

3 讨论

采用样品量 4~5 倍的甲醇使血浆中蛋白沉淀完全,无需采取二次提取的步骤,操作中对低质量浓度采用倍量进样测定,一次提取回收率大于 85%,简化了样品处理步骤。

家兔 ig 给予两种片剂后甘草酸和甘草次酸的主要药动学参数均无显著差异,相对生物利用度甘草酸为 (99.5 ± 29.0)%,甘草次酸为 (110.4 ± 46.3)%,以 AUC_{0-36} 和 C_{max} 为指标,经双单侧 t 检验,受试制剂和参比制剂生物等效,但在人体是否会得到相似的结论有待进一步探讨。

片剂的生物等效性试验动物一般宜选用犬和大鼠,但为了保持口服剂型的完整性,大鼠给药困难,而犬价格较贵。因此本实验选用家兔为实验动物对国产复方甘草酸苷片和进口市售产品美能片进行生物等效性评价。

谢物的体内分析在实验对象的选择,样品处理方法以及检测条件等方面进行了初步探讨,为今后采用 HPLC 法更有效地进行甘草类制剂的体内研究提供了参考。

参考文献:

- [1] Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin[stronger neo-minophagen C(SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Oncology*, 2002, 62(1): 94-100.
- [2] 张小丽. 复方甘草酸苷在非肝病治疗中的临床应用[J]. *浙江实用医学*, 2007, 12(2): 142-144.
- [3] Akao T. Differences in the metabolism of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and glycyrrhetic acid monoglucuronide by human intestinal flora [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23 (12): 1418-1423.
- [4] Ching H, Hou Y C, Hsiu S L, et al. Influence of honey on the gastrointestinal metabolism and disposition of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in rabbits [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(1): 87-91.
- [5] 黄 熙,张 莉,王骊丽,等,反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中的甘草酸铵[J]. *药物分析杂志*, 2001, 21(4): 233
- [6] Gao Q T, Chen X H, Bu K S. Comparative pharmacokinetic

- behavior of glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizic acid and Gancao-Fuzi-Tang [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(2): 221-228.
- [7] 项琪,程刚,陈济民. 芍药甘草汤在大鼠体内药代动力学研究[J]. *中国药理学杂志*, 2000, 35(9): 615-618.
- [8] Raggi M A, Maffei F, Bugamelli F, *et al*. Bioavailability of glycyrrhizin and licorice extract in rat and human plasma as detected by HPLC method [J]. *Pharmazie*, 1994, 49(4): 269-272.
- [9] Wang Z, Kurosaki Y, Nakayama T, *et al*. Mechanism of gastrointestinal absorption of glycyrrhizin in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(10): 1399-1403.

银杏叶总黄酮及其水解物静脉注射给药后在大鼠体内的药动学研究

冯小龙,王 伟,张兰桐*

(河北医科大学药学院 药物分析教研室,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 研究银杏叶提取物中黄酮类成分及其水解物大鼠尾 iv 给药后的药动学差异,同时研究内酯类成分对黄酮类成分药动学的影响。方法 以高效液相色谱法测定血浆中槲皮素、山柰素和异鼠李素,用 3p97 软件进行药动学参数的计算。结果 槲皮素药动学符合二房室模型,山柰素和异鼠李素的药动学符合非房室模型。银杏水解物中槲皮素的 $t_{1/2}$ 比银杏叶提取物中槲皮素的 $t_{1/2}$ 短,与水解物相比提取物的相对生物利用度低,水解物中异鼠李素的相对生物利用度高。结论 银杏黄酮糖苷在大鼠体内转化为黄酮苷元的量较少,苷元的相对生物利用度较高;内酯对黄酮的代谢无明显影响。

关键词:银杏;槲皮素;山柰素;异鼠李素;药动学

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)09-1402-05

银杏叶提取物的主要活性成分是黄酮类和萜内酯类化合物。黄酮类主要是由山柰酚、槲皮素和异鼠李素等的糖苷组成。研究表明,黄酮苷元的生物活性明显优于糖苷^[1],糖苷与苷元的体内过程有较大差异且不同苷元间可相互转化^[2,3]。银杏黄酮类成分药动学研究需对血浆样品进行水解后测定苷元,操作复杂,因水解后部分苷元的代谢产物转化为相应的苷元,测得的苷元量不准确^[4]。本实验旨在建立简易的同时测定血浆中槲皮素、山柰素和异鼠李素苷元的 HPLC 方法,比较大鼠尾静脉注射银杏叶提取物及其水解物后槲皮素、山柰素和异鼠李素药动学的差异,为银杏叶提取物制剂的进一步开发提供理论依据。

1 仪器与材料

Agilent1200 高效液相色谱仪;XW—80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂),L G16—W 高速离心机(北京医用离心机厂)。

槲皮素(批号 100081-200406)、山柰素(批号 110861-200405)和异鼠李素(批号 110860-200406)对照品均购自中国药品生物制品检定所;甲醇(色谱纯);银杏叶提取物由山东仁和制药有限公司提供。

Wistar 大鼠,雄性,200~250 g,由河北医科大

学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(冀)2007-1-003。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 银杏叶提取物的制备:按《中国药典》2005 年版一部制备。

2.1.2 银杏叶水解物的制备:取银杏叶提取物样品溶解于水解液 25%盐酸-甲醇(1:4)中,80℃ 加热回流 30 min,迅速冷至室温,每次用 1/2 体积乙醚-丙酮(15:1)萃取,共 3 次,合并有机相并减压蒸干即得。

2.1.3 无内酯银杏叶提取物的制备:取银杏叶提取物适量溶解于 60℃ 水中,每次用 1/2 体积醋酸乙酯萃取,共 3 次,除去内酯类成分;水相减压分离水中溶解的醋酸乙酯后,用 1/2 体积正丁醇萃取,共 4 次,合并正丁醇相并减压蒸干即得银杏总黄酮。

2.1.4 无内酯银杏叶水解物的制备:取银杏总黄酮(去除萜内酯)样品按“银杏叶水解物的制备”的方法制备,即得。

2.2 给药剂量的确定:4 个样品和槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品均用丙二醇、乙醇和水组成的复合溶剂配制制成适当质量浓度的溶液,经 0.22 μm 微孔

* 收稿日期:2008-12-28

作者简介:冯小龙(1976—),男,河北医科大学药学院博士研究生,研究方向为中药有效成分的药物代谢研究。

*通讯作者 张兰桐 Tel/Fax:(0311)86266419 E-mail:zhanglantong@263.net